

Rec'd PCT/PTO 30 DEC 2004 519 824

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/005451 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12G 1/00**

[DE/DE]; Oswaldstrasse 23, 60439 Frankfurt am Main (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2003/007080**

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. Juli 2003 (03.07.2003)

(74) Anwälte: **ZOUNEK, Nikolai** usw.; Patentanwaltskanzlei
Zounek, Industriepark Kalle-Albert, Rheingastrasse 190-
196, 65174 Wiesbaden (DE).

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
102 35 348.4 3. Juli 2002 (03.07.2002) **DE**

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **DADE BEHRING MARBURG GMBH** [DE/DE];
Emil-von-Behringstrasse 76, 35041 Marburg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BÖHM, Martina**

(54) Title: **METHOD FOR DETECTING THE VON WILLEBRAND FACTOR-CLEAVING PROTEASE ACTIVITY OF ADAMTS-13**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM NACHWEIS DER VON WILLEBRAND-FAKTOR-SPALTENDEN PROTEASE-AKTIVITÄT VON ADAMTS-13**

(57) Abstract: The invention relates to a diagnostic method for determining the von Willebrand factor (VWF) cleaving activity of ADAMTS-13 in a test medium during which the test medium is mixed with 0.5 to 5 U/ml of a von Willebrand factor (VWF) that does not contain ADAMTS-13, and after incubation, the ADAMTS-13 activity is determined based on the drop in the VWF-mediated aggregation of thrombocytes.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein diagnostisches Verfahren zur Bestimmung der VWF-spaltenden Aktivität von ADAMTS-13 in einem Testmedium beschrieben, wobei man das Testmedium mit 0,5 bis 5 U/ml eines ADAMTS-13-freien von WillebrandFaktors (VWF) versetzt und nach Inkubation die ADAMTS-13- Aktivität über den Abfall der VWFvermittelten Aggregation von Thrombozyten feststellt.



WO 2004/005451 A2

Verfahren zum Nachweis der von Willebrand-Faktor-spaltenden Proteaseaktivität von ADAMTS-13

5 Gegenstand der Erfindung ist ein diagnostisches Verfahren zum Nachweis der VWF-spaltenden ADAMTS-13-Aktivität im Blutplasma und anderen Medien.

Die thrombotische, thrombozytopenische Purpura (TTP) ist eine Erkrankung, bei der die klassischen Symptome der Thrombozytopenie, der mikroangiopathischen, hämolytischen Anämie, neurologische Symptome, Nierenfunktionsstörungen und Fieber beobachtet werden. Ungewöhnlich große Multimere des von Willebrand-Faktors (VWF) werden im Plasma von TTP-Patienten gefunden und als Ursache für die Bildung von VWF- und Thrombozyten-reichen Thromben angesehen. Der von Willebrand-Faktor wird von Endothelzellen in Form großer Multimere freigesetzt, die im normalen Plasma durch das Zusammenwirken einer Reduktase und einer Metalloprotease gespalten werden.

Es ist außerdem bereits bekannt, dass ein Mangel an einer spezifischen Metalloprotease, die den VWF zwischen den Peptidbindungen Tyr842 und Met843 spaltet, bei Patienten mit angeborener und erworbener TTP beobachtet wird. Diese Metalloprotease wurde kürzlich als ein neues Mitglied der ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs)-Familie identifiziert und als ADAMTS-13 bezeichnet (1-3).

Die VWF-spaltende Proteaseaktivität von ADAMTS-13 wird im folgenden lediglich als ADAMTS-13-Aktivität bezeichnet. Die ADAMTS-13-Aktivität wird normalerweise durch Inkubation einer, mit Harnstoff oder Guanidiumhydrochlorid behandelten, VWF-Probe mit verdünntem Plasma bei niedriger Ionenstärke gemessen. Der Nachweis der Proteolyse erfolgt durch eine Multimeranalyse mittels der SDS-Agarosegelelektrophorese oder durch Bruchstückanalyse mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließendem Immun-Blotting, also dem Nachweis der Proteine auf einer Cellulosemembran mittels der Antigen-Antikörper-Reaktion (4, 5). Der ADAMTS-13-katalysierte Abbau des von Willebrand-Faktors kann auch durch die Messung der Kollagen-

Bindungsaktivität des VWF (WO-A 00/50904) oder durch einen spezifischen, zweiseitigen ELISA-Nachweis (6) ermittelt werden. Kürzlich ist auch ein rekombinanter, monomerer VWF, der am N-Terminus mit einem grünfluoreszierenden Protein markiert worden ist, zur Bestimmung der Proteolyse beschrieben worden (7).

Die herkömmlichen elektrophoretischen Verfahren sind nur in spezialisierten Forschungslabors ausführbar, da die Durchführung der Teste spezielle Laborausrüstung und die notwendige Expertise benötigt. Der Kollagenbindungstest (WO-A 00/50904) und der spezifische ELISA (6) zum Nachweis der proteolytischen Aktivität von ADAMTS-13 vereinfachen die ADAMTS-13-Aktivitätsbestimmung, können jedoch ebenfalls nur in Labors durchgeführt werden, welche über die entsprechende Ausrüstung und das notwendige Know-how verfügen. Bei dem zweiseitigen ELISA werden zudem spezifische monoklonale Antikörper benötigt, welche nur wenigen Labors zur Verfügung stehen, da sie nicht kommerziell erhältlich sind. Es stellte sich daher die Aufgabe, ein einfaches Verfahren für die Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität zu entwickeln. Dieses neuartige Verfahren sollte eine zuverlässige und zeitnahe Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität im Blutplasma und anderen Körperflüssigkeiten (z. B. Blutserum, Speichel) und anderen Medien erlauben. Es sollte in jedem klinischen Routine-Gerinnungslabor anwendbar sein, ergo keine spezielle Laborausrüstung, besonderes technisches Know-how oder nicht kommerziell erhältliche Reagenzien benötigen. Das neuartige Verfahren sollte zudem eine möglichst weitreichende Automatisierung im Gerinnungsautomaten zulassen, um einen hohen Probendurchsatz mit niedrigem Arbeitskostenaufwand zu ermöglichen. Da sich inzwischen gezeigt hat, dass auch bei anderen Krankheiten als bei TTP geringe ADAMTS-13-Aktivitäten zu beobachten sind (8), sollte ein derartiges Verfahren die Differenzierung zwischen dem für die TTP charakteristischen schweren ADAMTS-13-Mangel und dem milden ADAMTS-13-Mangel ermöglichen. Eine frühzeitige Diagnose und damit eine schnelle Einleitung der Plasmapherese-Therapie determiniert im wesentlichen den klinischen Verlauf der oft lebensbedrohlichen TTP-Episode. Das neuartige Verfahren sollte aus diesem Grunde eine schnelle und möglichst flächendeckende Bestimmung der

ADAMTS-13-Aktivität ermöglichen. Die zeitnahe Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität ist auch aufgrund alternativer Therapieoptionen unerlässlich. Insbesondere sollte das Verfahren einen schnellen Nachweis eines Inhibitors gegen ADAMTS-13 bzw. die Bestimmung des Inhibitortiters ermöglichen, da sich daraus verschiedene Therapiemöglichkeiten (z. B. Rituximab oder Immunadsorption) ergeben. Das Verfahren sollte insbesondere auch eine Differenzierung zwischen congenitaler und erworbener TTP erlauben. Eine zeitnahe und routinefähige Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität ist darüber hinaus die Voraussetzung für den Einsatz der potentiell verfügbaren, rekombinanten ADAMTS-13 (W0242441). Das Verfahren sollte nicht nur eine zeitnahe Diagnose und Überwachung der Therapie von TTP-Patienten gestatten, sondern zudem eine zuverlässige Quantifizierung der ADAMTS-13-Aktivität in beliebigen Medien erlauben. Da ADAMTS-13 ein wichtiger Regulator für den VWF darstellt und damit einen bedeutender Faktor für die Hämostase darstellt, sollte das neuartige Verfahren in mannigfaltigen Studien zur Bedeutung der ADAMTS-13-katalysierten Proteolyse des VWF bei Gesunden und Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen anwendbar sein.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass sich die ADAMTS-13-katalysierte Proteolyse des VWF durch dessen Fähigkeit zur Aggregation von Thrombozyten detektieren lässt. Die Spaltung des VWF durch ADAMTS-13 führt zu einer Verkürzung der VWF-Multimere. Die Fähigkeit des VWF zur Aggregation von Thrombozyten wird im wesentlichen von der Länge der Multimeren bestimmt. Je größer die VWF-Multimere sind, desto höher ist ihre Bindungskapazität für Thrombozyten. Dieser Zusammenhang wurde in dem erfindungsgemässen Verfahren ausgenutzt, um die ADAMTS-13-Aktivität zu bestimmen.

Die Erfindung betrifft dementsprechend ein diagnostisches Verfahren zur Bestimmung der VWF-spaltenden Aktivität von ADAMTS-13 in einem Testmedium, wobei man das Testmedium mit 0,5 bis 5 U/ml eines ADAMTS-13-freien von Willebrand-Faktors (VWF) versetzt und nach Inkubation die ADAMTS-13-Aktivität über den Abfall der VWF-vermittelten Aggregation von Thrombozyten feststellt.

Testmedium im Sinne der Erfindung sind alle Körperflüssigkeiten wie z. B. Blutplasma, Blutserum, Speichel und Liquor und andere Testmedien wie z. B. Zellkulturüberstand oder Zellextrakte.

- 5 Das Testmedium wird mit einem ADAMTS-13-freien VWF versetzt, welcher im folgenden als VWF-Substrat bezeichnet wird. Als VWF-Substrat wird bevorzugt ein hochgereinigter, plasmatischer VWF verwendet, welcher das für Normalplasma typische Multimerenmuster aufweist und frei von endogener ADAMTS-13-Aktivität ist. Es können allerdings auch verschiedene andere VWF-Substrate
10 verwendet werden, welche keine ADAMTS-13-Aktivität aufweisen wie z. B. rekombinanter VWF, VWF aus Zellkulturüberstand oder plasmatischer VWF, bei welchem die ADAMTS-13-Aktivität irreversibel gehemmt worden ist.

- Das typische Multimerenmuster eines hochgereinigten, plasmatischen VWF ist
15 in Figur 1 A in der ersten Spalte dargestellt. Die nachfolgenden 7 Spalten zeigen den zeitabhängigen Verlust der hochmolekularen VWF-Multimere durch die ADAMTS-13-katalysierte Proteolyse. Dazu wurde einem Testansatz nach den in Figur 1 A angegebenen Inkubationszeiten (0.5 – 22 h) eine Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von EDTA gestoppt. Nachfolgend wurden
20 die Proben gemäß üblicher Standardmethoden durch SDS-Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch anschließendes Immun-Blotting dargestellt. Zudem wurden dem Reaktionsansatz nach den entsprechenden Inkubationszeiten eine Probe für die Bestimmung der funktionalen Aktivität des VWF entnommen. Dazu wurde die Fähigkeit des VWF zur Aggregation von Blutplättchen in
25 Gegenwart von Ristocetin bestimmt, welche gemeinhin als Ristocetin-Kofaktor-Aktivität bezeichnet wird (RCo). Die Bestimmung der RCo-Aktivität erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen sogenannten BC von Willebrand-Reagenz von Dade Behring (Marburg, Deutschland). Die so gemessene RCo-Aktivität der entsprechenden Proben ist unter den Spalten des Immun-Blottings in Figur 1 A
30 angegeben. Es ist ersichtlich, dass der zeitabhängige ADAMTS-13-katalysierte Verlust der hochmolekularen VWF-Multimere zu einem deutlichen Verlust der RCo-Aktivität von 357 % am Anfang der Reaktion bis zu 13 % nach 22 Stunden Inkubationszeit führt. Die Figur 1 B illustriert nochmals diesen zeitabhängigen

ADAMTS-13-katalysierten Verlust der RCo-Aktivität des zugegebenen VWF-Substrates in dem Reaktionsmedium.

Im allgemeinen geht man bei dem erfindungsgemäßen Verfahren so vor, dass man 0,5 - 5 U/ml, bevorzugt 1 - 3 U/ml, eines ADAMTS-13-freien von Willebrand-Faktors (VWF) mit dem verdünnten Testmedium, z. B. Blutplasma versetzt. Das Testmedium sollte dabei so verdünnt sein, dass der endogene VWF vernachlässigbar ist, d. h. er löst keine detektierbare Aggregation von Thrombozyten aus. ADAMTS-13-freier VWF und das verdünnte Testmedium werden dann ausreichend lange, vorzugsweise 0,1 - 24 Stunden, besonders bevorzugt 6 - 15 Stunden, inkubiert. Nach vorliegenden Untersuchungen erscheint es sogar möglich, die Inkubationszeit auf 0,5 - 6 Minuten, vorzugsweise 1 bis 3 Minuten, zu reduzieren. Diese Inkubation erfolgt zweckmäßigerweise in einem niedrig-molaren Reaktionspuffer (z. B. 5 - 20 mmol/l TRIS-HCl, pH8) und bevorzugterweise in Gegenwart von zweiwertigen Kationen, z. B. Ba^{2+} oder Ca^{2+} , eines Serinproteaseinhibitors, z. B. PefablocSC, und Harnstoff. Die bevorzugte Konzentration an zweiwertigen Kationen im Reaktionsmedium beträgt 5 bis 15 mmol/l, besonders bevorzugt 7 - 9 mmol/l. Die bevorzugte Konzentration an Pefabloc im Reaktionsmedium beträgt 0,5 bis 6,5 mmol/l, besonders bevorzugt 0,75 mmol/l. Die bevorzugte Konzentration von Harnstoff im Reaktionsmedium beträgt 0,5 bis 3 mol/l, besonders bevorzugt 1,5 mol/l. Nach der ausreichenden Inkubation wird die verbliebene Fähigkeit des VWF-Substrates zur Aggregation von Thrombozyten bestimmt. Diese kann beispielsweise anhand der Ristocetin-Kofaktoraktivität (welche die VWF vermittelte Aggregation der Thrombozyten in Gegenwart von Ristocetin beschreibt), vorzugsweise mit dem kommerziell erhältlichen BC von Willebrand-Reagenz von Dade Behring (Marburg, Deutschland), gemessen werden und erfolgt bevorzugt automatisiert an einem Gerinnungsautomaten. Dazu wird das Reaktionsmedium mit einer bestimmten Menge von Thrombozyten und Ristocetin versetzt. Die bevorzugte Konzentration von Blutplättchen im Testansatz beträgt 100000 bis 1000000 Thrombozyten/ μl , besonders bevorzugt 500000 bis 200000 Thrombozyten/ μl . Die bevorzugte Konzentration von Ristocetin im Testansatz beträgt 0.5 bis 3 mg/ml, besonders bevorzugt 1 bis 2 mg/ml. Das VWF-Substrat im Reaktionsmedium verursacht in

Gegenwart von Ristocetin eine Aggregation der Thrombozyten. Die ablaufende Aggregation vermindert die Trübung des Reaktionsansatzes. Durch Messung der optischen Dichte kann somit die Fähigkeit des VWF-Substrates zur Thrombozytenaggregation quantifiziert wird. Die so bestimmte verbliebene Ristocetin-

5 Kofaktor-Aktivität des VWF-Substrates im Reaktionsmedium ist abhängig von der ADAMTS-13-Aktivität in dem Testmedium. Je mehr ADAMTS-13-Aktivität im Testmedium vorliegt, desto mehr wird das zugegebene VWF-Substrat abgebaut und verliert seine Fähigkeit zur Aggregation von Thrombozyten. Für eine Eichung wird humanes Normalplasma verwendet, welches mit variierenden

10 Mengen inaktiviertem (die Aktivität von ADAMTS-13 ist inaktiviert) humanem Normalplasma verdünnt ist. Die Inaktivierung kann beispielsweise mittels Erhitzung erfolgen. Dieser Zusammenhang ist in Figur 2 dargestellt. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Verdünnungen des humanen Normalplasmas (1:21-Verdünnung = 100%). Die y-Achse zeigt die Fähigkeit der entsprechenden Pro-

15 be zur Aggregation von Thrombozyten in Gegenwart von Ristocetin, gemessen in Extinktionsabnahme in 90 Sekunden ($mE/1,5 \text{ min}$). Die Verdünnung des Normalplasmas führt zu einem limitierten Verlust an ADAMTS-13-Aktivität in der Testprobe, wobei die 1:21-Verdünnung als 100 % definiert wurde. Unter den Bedingungen des erfindungsgemäßen Verfahrens determiniert der Gehalt an

20 ADAMTS-13 im Testmedium die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität des Substrates im Reaktionsmedium. Der Zusammenhang zwischen ADAMTS-13-Aktivität im Testmedium und Ristocetin-Kofaktor-Aktivität im Reaktionsmedium kann durch eine Gleichung folgender Art beschrieben werden: $y=A+(D-A)/(1+e^{(B \cdot (c-x))})$, (berechnet mit Easy fit, version 5.14, Software von Tecan, Basel, Switzerland). Die

25 Bestimmung der Ristocetin-Kofaktor-Aktivität des VWF erfolgt üblicherweise im Plasma (DE 199 64 109 A 1) und ist ein gängiger und schneller Test in jedem gut ausgestatteten Routine-Gerinnungslabor. Die erfolgreiche Anwendung des Testes im erfindungsgemäßen Verfahren ist insbesondere überraschend, da hier die RCo-Aktivität eines VWF-Substrates in einem sehr unphysiologischen

30 Reaktionsmedium mit niedriger Pufferkonzentration und in Gegenwart von einem Serinproteaseinhibitor und Harnstoff gemessen wird. Üblicherweise dient der RCo-Aktivitätstest zur Bestimmung der RCo-Aktivität in einer gegebenen Plasmaprobe. In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird stattdessen das

Plasma (bzw. das entsprechende Testmedium) soweit verdünnt, dass der endogene VWF keine detektierbare Aggregation der Thrombozyten auslösen kann, d. h. die endogene RCo-Aktivität $< 2.5\%$ ist. Dem so verdünnten Plasma wird unter den beschriebenen Bedingungen ein exogener ADAMTS-13-freier VWF zugesetzt, welcher durch die ADAMTS-13-Aktivität in der verdünnten Plasmaprobe abgebaut wird. Der Abbau des exogenen VWF-Substrates wird mittels Bestimmung der RCo-Aktivität quantifiziert. Die neuartige Verwendung eines bekannten, weit verbreiteten und routinefähigen Testes in dem erfindungsgemäßen Verfahren erlaubt die Anwendung des Verfahrens in jedem gut ausgestatteten Routine-Gerinnungslabor.

Schematisiert kann das erfindungsgemäße Verfahren beschrieben werden als

- Einwirkung der im Testmedium vorhandenen ADAMTS-13 auf ein ADAMTS-13-freies VWF-Substrat und damit Verändern der VWF-Aktivität (Verkürzen der VWF-Multimeren)
- Messen der veränderten VWF-Aktivität durch Bestimmung der VWF-vermittelten Aggregation von Thrombozyten in Gegenwart von Ristocetin
- Gleichsetzen des Ausmaßes der Reduzierung der VWF-Aktivität mit der ADAMTS-13-Aktivität des Testmediums.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann aber auch umgekehrt werden:

- Aggregation von Thrombozyten durch ADAMTS-13-freien VWF in Gegenwart oder Abwesenheit von Ristocetin
- Inkubation mit Testmedium, welches ADAMTS-13 enthält
- Dadurch Verändern der VWF-Aktivität, welches zur Dissoziation der Thrombozytenaggregate führt
- Gleichsetzen des Ausmaßes der Dissoziation mit der ADAMTS-13-Aktivität des Testmediums.

In einer speziellen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann das ADAMTS-13-freie VWF-Substrat auch an eine Festphase, z. B. eine Mikro-

titerplatte, oder einen Mikropartikel, z. B. über einen spezifischen Bindungspartner, assoziiert sein.

Der Begriff "Festphase" im Sinne dieser Erfindung beinhaltet einen Gegenstand, der aus porösem und/oder nicht porösem, in der Regel wasserunlöslichem Material besteht und die unterschiedlichsten Formen aufweisen kann wie z. B. Gefäß, Röhrchen, Mikrotitrationsplatte, Kugel, Mikropartikel, Stäbchen, Streifen, Filter- oder Chromatographiepapier etc. In der Regel ist die Oberfläche der Festphase hydrophil oder kann hydrophil gemacht werden. Die Festphase kann aus den unterschiedlichsten Materialien bestehen wie z. B. aus anorganischen und/oder aus organischen Materialien, aus synthetischen, aus natürlich vorkommenden und/oder aus modifizierten natürlich vorkommenden Materialien. Beispiele für Festphasenmaterialien sind Polymere wie z. B. Zellulose, Nitrozellulose, Zelluloseacetat, Polyvinylchlorid, Polyacrylamid, vernetzte Dextranmoleküle, Agarose, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen, Polymethacrylat oder Nylon; Keramik; Glas; Metalle, insbesondere Edelmetalle wie Gold und Silber; Magnetit; Mischungen oder Kombinationen derselben; etc. Auch Zellen, Liposomen oder Phospholipidvesikel sind vom Begriff Festphase miterfasst.

Die Festphase kann einen Überzug aus einer oder mehreren Schicht/en aufweisen, z. B. aus Proteinen, Kohlehydraten, lipophilen Substanzen, Biopolymeren, organischen Polymeren oder Mischungen hiervon, um beispielsweise die unspezifische Bindung von Probenbestandteilen an die Festphase zu unterdrücken oder zu verhindern oder um beispielsweise Verbesserungen zu erreichen hinsichtlich der Suspensionsstabilität von partikulären Festphasen, der Lagerstabilität, der formgebenden Stabilität oder der Resistenz gegen UV-Licht, Mikroben oder sonstige zerstörend wirkender Agenzien.

Unter dem Begriff "Mikropartikel" sind im Sinne dieser Erfindung Teilchen zu verstehen, die einen ungefähren Durchmesser von wenigstens 20 nm und nicht mehr als 20 µm aufweisen, üblicherweise zwischen 40 nm und 10 µm, bevorzugt zwischen 0,1 und 10 µm, besonders bevorzugt zwischen 0,1 und 5 µm, ganz besonders bevorzugt zwischen 0,15 und 2 µm. Die Mikropartikel können

regelmäßig oder unregelmäßig geformt sein. Sie können Kugeln, Spheroide, Kugeln mit mehr oder weniger großen Kavitäten oder Poren darstellen. Die Mikropartikel können aus organischem, aus anorganischem Material oder aus einer Mischung oder Kombination von beiden bestehen. Sie können aus einem

5 porösen oder nicht porösen, einem schwellfähigen oder nicht schwellfähigen Material bestehen. Prinzipiell können die Mikropartikel jegliche Dichte haben, bevorzugt sind jedoch Partikel mit einer Dichte, die der Dichte des Wassers nahekommt wie etwa 0,7 bis etwa 1,5 g/ml. Die bevorzugten Mikropartikel sind in wässrigen Lösungen suspendierbar und möglichst lange suspensionsstabil. Sie

10 mögen durchsichtig, teilweise durchsichtig oder undurchsichtig sein. Die Mikropartikel können aus mehreren Schichten bestehen wie beispielsweise die sogenannten "core-and-shell"-Partikel mit einem Kern und einer oder mehreren umhüllenden Schicht/en. Der Begriff Mikropartikel umfasst beispielsweise Farbstoffkristalle, Metallsolen, Silica-Partikel, Glaspartikel, Magnetpartikel, Partikel

15 mit chemolumineszierenden und/oder fluoreszierenden Substanzen, Polymerteilchen, Öltropfen, Lipidpartikel, Dextran und Proteinaggregate. Bevorzugte Mikropartikel sind in wässrigen Lösungen suspendierbare und aus wasserunlöslichem Polymermaterial bestehende Partikel, insbesondere aus substituierten Polyethylenen. Ganz besonders bevorzugt sind Latexpartikel z. B. aus Polystyrol, Acrylsäurepolymeren, Methacrylsäurepolymeren, Acrylnitril-Polymeren,

20 Acrylnitril-Butadien-Styrol, Polyvinylacetat-Acrylat, Polyvinylpyridin, Vinylchlorid-Acrylat. Von besonderem Interesse sind Latexpartikel mit reaktiven Gruppen an ihrer Oberfläche wie beispielsweise Carboxyl-, Amino- oder Aldehydgruppen, die eine kovalente Bindung z. B. von spezifischen Bindungspartnern an die Latexpartikel erlauben. Die Herstellung von Latexpartikeln ist beispielsweise in EP

25 0 080 614, EP 0 227 054 und EP 0 246 446 beschrieben.

Ein Mikropartikel kann einen Überzug aus einer oder mehreren Schicht/en aufweisen, z. B. aus Proteinen, Kohlehydraten, Biopolymeren, organischen Polymeren oder Mischungen hiervon, um beispielsweise die unspezifische Bindung

30 von Probenbestandteilen an die Partikeloberfläche zu unterdrücken oder zu verhindern oder um beispielsweise Verbesserungen zu erreichen hinsichtlich der Suspensionsstabilität der Mikropartikel, der formgebenden Stabilität oder

der Resistenz gegen UV-Licht, Mikroben oder sonstige zerstörend wirkende Agenzien. So kann dieser Überzug insbesondere aus Proteinschichten oder Polymerschichten wie z. B. Cyclodextrine, Dextrane, Hydrogele, Albumin oder Polyalbumine bestehen, die z. B. kovalent oder adsorptiv auf die Mikropartikel
5 aufgebracht wurden.

Der Begriff "assoziiert" umfasst beispielsweise eine kovalente und eine nicht-kovalente Bindung, eine direkte und eine indirekte Bindung, die Adsorption an eine Oberfläche und den Einschluss in eine Vertiefung oder einen Hohlraum
10 etc.. Üblicherweise spricht man von einer kovalenten Bindung zwischen zwei Molekülen, wenn wenigstens ein Atomkern des einen Moleküls Elektronen mit wenigstens einem Atomkern des zweiten Moleküls teilt. Beispiele für eine nicht-kovalente Bindung sind die Oberflächenadsorption, der Einschluss in Hohlräume oder die Bindung von zwei spezifischen Bindungspartnern. Neben einer
15 direkten Bindung kann der zu bindende Gegenstand auch indirekt über spezifische Wechselwirkung mit spezifischen Bindungspartnern an die Festphase gebunden sein.

Unter einem "spezifischen Bindungspartner" ist ein Mitglied eines spezifischen
20 Bindungspaares zu verstehen. Bei den Mitgliedern eines spezifischen Bindungspaares handelt es sich um zwei Moleküle, die jeweils mindestens eine zu einer Struktur des anderen Moleküls komplementäre Struktur aufweisen, wobei die beiden Moleküle sich über eine Bindung der komplementären Strukturen zu binden vermögen. Der Begriff Molekül umfasst auch Molekülkomplexe wie z. B.
25 Enzyme, die aus Apo- und Coenzym bestehen, Proteine, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, Lipoproteine, bestehend aus Protein und Lipiden etc.. Spezifische Bindungspartner können natürlich vorkommende, aber auch z. B. mittels chemischer Synthese, mikrobiologischer Techniken und/oder gentechnologischer Verfahren hergestellte Substanzen sein. Zur Illustration des Begriffs
30 spezifischer Bindungspartner, aber nicht als Einschränkung zu verstehen, sind z. B. zu nennen: Thyroxinbindendes Globulin, steroidbindende Proteine, Antikörper, Antigene, Haptene, Enzyme, Lektine, Nukleinsäuren, Repressoren, Oligo- und Polynukleotide, Protein A, Protein G, Avidin, Streptavidin, Biotin, Kom-

plementkomponente C1q, nukleinsäurebindende Proteine, etc.. Spezifische Bindungspaare sind beispielsweise: Antikörper-Antigen, Antikörper-Hapten, Operator-Repressor, Nuclease-Nukleotid, Biotin-Avidin, Lektin-Polysaccharid, Steroid-steroidbindendes Protein, Wirkstoff-Wirkstoffrezeptor, Hormon-Hormonrezeptor, 5 Enzym-Substrat, IgG-Protein A, komplementäre Oligo- oder Polynukleotide, etc..

10 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens kann dieses auch unter Einwirkung von Scherkräften z. B. in einem fließenden Medium durchgeführt werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Diagnose-Kit, enthaltend einen ADAMTS-13-freies VWF-Substrat, Thrombozyten und gegebenenfalls Ristocetin.

15 Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung eines Reagenzes zum Nachweis der VWF-Aktivität zum Nachweis der Aktivität von ADAMTS-13.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert:

Beispiele

20 Das erfindungsgemäße Verfahren wurde ausführlich mit der bisher angewendeten Immun-Blotting-Methode verglichen. Das erfindungsgemäße Diagnoseverfahren wurde zur Ermittlung der ADAMTS-13-Aktivität an 14 TTP-Patienten während akuter Anfälle, im Verlauf der Therapie und in Remission, außerdem 25 an 80 gesunden Probanden sowie an 23 Patienten mit Thrombozytopenie und/oder Hämolyse und an 14 Patienten mit dem Antiphospholipidsyndrom (APS) eingesetzt.

1. Plasmaproben

30 Mit Zitrat versetzte Plasmaproben wurden von 14 Patienten bei 22 akuten TTP-Anfällen vor dem Plasmaaustausch mit frischgefrorenem Plasma gewonnen. Die anfängliche Diagnose basierte auf klinischen Symptomen (vor allem neuro-

logischen Störungen) und Laborbefunden wie schwerer Thrombozytopenie und dem Nachweis einer mikroangiopathischen, hämolytischen Anämie. Von 11 Patienten wurden auch Plasmaproben in Remission gewonnen. Von 10 Patienten konnte auch Blut während der Plasmaaustauschtherapie erhalten werden. Außerdem wurden Plasmaproben von 23 Patienten mit akuter Thrombozytopenie und/oder Hämolyse, 14 Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom und 80 gesunden Probanden analysiert. Thrombozytenarmes Plasma wurde durch Zentrifugation über 40 Minuten bei 4 °C und 2500 g hergestellt. Der Überstand wurde anschließend bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

10

2. Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität durch das erfindungsgemäße Verfahren

Plasmaproben wurden 1:21 mit 5 mM Tris-HCL-Puffer, pH 8, der 12,5 mM Bariumchlorid (BaCl_2) und 1 mM PefaBloc SC, einem Inhibitor von Serumproteasen (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) verdünnt und dann 5 Minuten bei 37 °C zur Aktivierung der Protease inkubiert. Als Substrat wurde ein gereinigter VWF (Concendre de Facteur Willebrand Humain Tres Haute Purite, LFB France) eingesetzt. Das Konzentrat, welches frei von dedektierbarer ADAMTS-13-Aktivität war, wurde mit aqua ad iniectionabilia auf eine Konzentration von 100 U/ml rekonstituiert, aufgeteilt und bei -20 °C bis zu Verwendung gelagert. Vor der Einwirkung der Protease wurde das Substrat aufgetaut, im Verhältnis 1:20 mit 5 M Harnstoff in 5 mM Tris-HCL, pH 8, verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 100 µl der Substratlösung zu 210 µl verdünntem Plasma gegeben und über Nacht bei 37 °C einwirken gelassen. Danach wurde die restliche Ristocetin-Kofaktor-Aktivität des zugegebenen VWF-Substrates im Reaktionsmedium mit dem kommerziellen, so genannten BC von Willebrand-Reagenz von Dade Behring (Marburg, Deutschland) ermittelt. Die ADAMTS-13-Aktivität einer von 80 offensichtlich gesunden, erwachsenen Personen gewonnenen Plasmamischung in einer Verdünnung von 1:21 wurde als 100 % definiert. Zur Eichung wurden Reihenverdünnungen des Plasmapools von 1:2 bis 1:32 mit hitzebehandeltem Plasmapool hergestellt. Für die Hitzebehandlung wurde der Plasmapool 30 min bei 60 °C inkubiert und anschließend 5

min bei 13000 UPM (Biofuge A, Heraeus) zentrifugiert, um Proteinaggregate zu sedimentieren. Das so behandelte Plasma enthielt keine detektierbare ADAMTS-13-Aktivität. Die verschiedenen Verdünnungen wiesen somit definierte, prozentuale Mengen an ADAMTS-13-Aktivität auf. Die so gewonnene Eichkurve ist in Figur 2 dargestellt. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Verdünnungen des Normalplasmapools aufgetragen, die definitionsgemäß 200 bis 0 % ADAMTS-13-Aktivität aufweisen. Die y-Achse zeigt die Fähigkeit der entsprechenden Probe zur Aggregation von Thrombozyten in Gegenwart von Ristocetin, gemessen in Extinktionsabnahme während der Messzeit von 90 Sekunden (mE/1.5 min).

3. Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität durch die Immun-Blotting-Methode (Vergleichsbeispiel)

Zur Messung der ADAMTS-13-Aktivität durch die Immun-Blotting-Methode wurde eine Variante der zuerst von Furlan et al. und Tsai (4, 5) beschriebenen Methode verwendet. Plasmaproben wurden im Verhältnis 1:5 mit 5 mM Tris-Puffer, pH 8 einschließlich 12,5 mM BaCl_2 und 1 mM PefaBloc SC verdünnt und die Aktivierung und Einwirkung der Protease in gleicher Weise durchgeführt, wie es für das erfindungsgemäße Verfahren beschrieben ist. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dinatrium-EDTA bis zu einer Endkonzentration von 23,5 mM gestoppt. Die Multimeranalyse wurde durch SDS-Elektrophorese auf einer 1,4%-igen Agarose (Seakem HGT von Biozym Diagnostics, Hess, Oldenburg, Deutschland) durchgeführt und zum Immun-Blotting wurde ein mit Peroxidase konjugierter Anti-VWF-Antikörper (P0226 von Dako-Glostrup, Dänemark) eingesetzt. Zur quantitativen Bestimmung wurden Reihenverdünnungen von normalem Plasma getestet, wie es bereits vorstehend beschrieben ist. Die Ergebnisse eines beispielhaften Testes nach der Immun-Blotting Methode sind in Figur 3 abgebildet. Für die Eichung wurde verschiedene Verdünnung (1:5 bis 1:160) eines humanen Normalplasmas mit VWF-Substrat versetzt. Die Verdünnungen enthalten definitionsgemäß 100 bis 0 % ADAMTS-13-Aktivität (Spalten 1-7; 1:5 Verdünnung = 100%). Die Spalten 8-10 zeigen Plasmaproben von Pa-

tienten mit TTP. Die ADAMTS-13-Aktivität der Testproben wird anhand der Eichung in den Spalten 1-7 abgeschätzt.

4. Inhibitortest

5

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13 verwendet werden. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13 ist insbesondere für die Unterscheidung zwischen congenitaler und erworbener TTP von entscheidender klinischer Bedeutung. Des weiteren ist der Nachweis eines Inhibitors bzw. die Bestimmung des Inhibitortiters für die Entscheidung über alternative Therapieoptionen (z. B. Rituximab oder Immunadsorption) unerlässlich. Zur Testung der inhibitorischen Aktivität gegen ADAMTS-13 wurden Plasmaproben, entweder rein oder verdünnt mit hitzbehandeltem Plasmapool, mit gleichen Anteilen Normalplasma gemischt. Zum Vergleich wurde das Normalplasma 1:1 mit hitzebehandeltem Plasmapool gemischt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wurde in den Mischungen die ADAMTS-13-Aktivität mit der erfindungsgemäßen Methode bzw. der bisher üblichen Immun-Blotting-Methode bestimmt. Die ADAMTS-13-Aktivität der Testprobe wurde durch die Aktivität der Vergleichsmischung geteilt und mit 100 multipliziert, um die Restaktivität der ADAMTS-13-Aktivität zu ermitteln. Zur quantitativen Bestimmung wurden Proben mit einer Restaktivität von 25 bis 75 % ausgewählt und die Menge des Inhibitors, wie es für Inhibitoren des Blutgerinnungsfaktors VIII beschrieben ist, ermittelt (8). Eine Probe, die eine Inhibition der normalen ADAMTS-13-Aktivität von 50 % verursacht, enthielt definitionsgemäß 1 U/ml Inhibitor.

25

5. Ergebnisse

Richtigkeit und Wiederholbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens

30

Die Richtigkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde bewiesen, indem 282 Plasmaproben von Patienten und gesunden Personen sowohl nach der herkömmlichen Immun-Blotting-Methode als auch nach dem erfindungsgemäßen

Verfahren getestet wurden. Die Ergebnisse sind in Figur 4 dargestellt. Die Ergebnisse der Immun-Blotting-Methode sind dabei in folgende Kategorien eingeteilt: schwerer ADAMTS-13-Mangel bei Aktivitäten von <12,5 % (Dreiecke), mittelschwerer ADAMTS-13-Mangel mit Aktivitäten zwischen 12,5 bis 25 % (Rauten), leichter ADAMTS-13-Mangel mit Aktivitäten zwischen 25 bis 50 % (Kreise) und normale ADAMTS-13-Aktivität mit Aktivitäten > 50 % (Vierecke). Die Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens für die entsprechenden Proben sind auf der y-Achse dargestellt. Für 71 von 72 Proben mit schwerem ADAMTS-13-Mangel wurden gleiche Ergebnisse anhand beider Methoden gefunden. Für eine Probe von einem TTP-Patienten während der Plasmapheresetherapie wurde in der Immun-Blotting-Methode eine Aktivität von 0 bis 12,5 % gemessen, während die gleiche Probe im erfindungsgemäßen Verfahren eine Aktivität von 18 % aufwies. Die 19 Proben mit mittelschwerem ADAMTS-13-Mangel gemäß der Immun-Blotting-Methode zeigten im erfindungsgemäßen Verfahren ADAMTS-13-Aktivitäten zwischen 9 und 39 %. Für die 64 Proben mit leichtem Proteasemangel gemäß der Immun-Blotting-Methode wurde mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Aktivitäten zwischen 20 und 60 % gemessen. Die 127 normalen Proben gemäß der Immun-Blotting-Methode zeigten im erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls normale Aktivitäten von >50 %. Zusammenfassend belegen die in Figur 4 abgebildeten Ergebnisse die gute Übereinstimmung der neuen Methode mit der herkömmlichen Immun-Blotting-Methode und beweisen damit, dass das herkömmliche und sehr aufwändige Immun-Blotting erfindungsgemäß durch Messung der VWF-vermittelten Thrombozytenaggregation ersetzt werden kann. Die erfindungsgemäße Methode ist reproduzierbar wie sich durch die sehr geringen Fehlergrenzen innerhalb einer Testreihe und zwischen verschiedenen Testreihen zeigt.

Klinische Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens

Die klinische Anwendbarkeit der neuen Methode konnte durch die an 51 Patienten erzielten Messergebnisse gezeigt werden, wobei 22 Anfälle von akuter TTP sowie andere thrombotische, thrombozytopenische und/oder hämolytische Erkrankungen untersucht wurden. Ein schwerer Mangel an ADAMTS-13-Aktivität

wurde nur bei Patienten mit akuter klassischer TTP beobachtet. Patienten mit niedrigen Inhibitorkonzentrationen reagierten auf den Plasmaaustausch mit einem Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität, während es bei Patienten mit hoher Inhibitorkonzentration nicht zu einem messbaren Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität kam, obwohl die Plasmaaustausch-Therapie zur klinischen Remission führte. Der beispielhafte Verlauf der ADAMTS-13-Aktivität für eine Patientin mit niedriger Inhibitorkonzentration bei Aufnahme (0,7 U/ml) ist in Figur 5 dargestellt. Die Patientin wurde mit insgesamt 36 Plasmapheresitzungen innerhalb von 50 Tagen erfolgreich therapiert. Die Plasmatherapie führt nach einem Frührezidiv am Tag 14 zu einem konsistenten Anstieg der ADAMTS-13-Aktivität. Dieser Anstieg ist eng mit dem Anstieg der Thrombozyten assoziiert, welche in Figur 5 durch die Kreise dargestellt sind. Die Figur verdeutlicht, dass der klinische Verlauf der TTP-Episode durch die, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren bestimmte, ADAMTS-13-Aktivität wiedergespiegelt werden kann.

Die Beispiele zeigen, dass das erfindungsgemäße diagnostische Verfahren die Messung der VWF-spaltenden Proteaseaktivität von ADAMTS-13 erlaubt. Der Vergleich der erfindungsgemäßen Methode mit dem bekannten Immun-Blotting-Verfahren zeigt die Richtigkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens. Das erfindungsgemäße Verfahren ist reproduzierbar und erfordert im Gegensatz zur herkömmlichen Immun-Blotting-Methode keine spezielle Laborausrüstung oder besonderes Know-how. Es wird vorzugsweise über Nacht durchgeführt, wobei die Inkubationszeit auch auf wenige Stunden oder Minuten verkürzt werden kann. Das erfindungsgemäße Verfahren ist weniger zeitaufwändig als das Immun-Blotting.

Mit dem erfindungsgemäßen diagnostischen Verfahren kann in jedem normal ausgestatteten Gerinnungslabor eine schnelle und sichere Bestimmung der ADAMTS-13-Aktivität erfolgen. Dies erlaubt insbesondere eine schnelle Diagnose der TTP und damit einen alsbaldigen Beginn der Therapie, was für eine erfolgreiche Behandlung einer akuten Episode wesentlich ist. Der frühzeitige Therapiebeginn erniedrigt die Anzahl der notwendigen Plasmaaustauschbehandlungen, was die Kosten der Therapie ganz erheblich erniedrigt.

Literaturverzeichnis:

1. Fujikawa, K., Suzuki, H., McMullen, B., Chung, D. (2001) Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. Blood 98: 1662 – 1666.
5
2. Gerritsen; H.E., Robles, R., Lämmele, B., Furlan, M. (2001) Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease Blood 98: 1654 – 1661.
10
3. Levy, G.G., Nichols, W.C., Lian, E.C. Foroud, T., McClintick, J.N., McGee, B.M., Yang, A.Y., Siemieniak, DR., Stark, K.R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S.B., Chandrasekaran, V., Stabler, S.P., Sabio, H., Bouhassira, E.E., Upshaw, J.D., Ginsburg, D., Tsai, H.M. (2001) Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature 413: 488 – 494.
15
4. Furlan, M., Robles, R., Lämmle, B., (1996) Partial purification and characterisation of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. Blood 10: 4223 – 4234.
20
5. Tsai, H.M. (1996) Physiologic Cleavage of von Willebrand factor by a Plasma Protease is dependent on its confirmation and requires Calcium ion. Blood 10: 4235 – 4244.
25
6. Obert B, Tout H, Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D, Girma JP (1999) Estimation of the Willebrand factor-cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to VWF. Thromb Haemost 82: 1382-1385
30
7. Raife TJ, Atkinsons B, Christopherson P, Jozwiak M, Montgomery RR (2001) Recombinant, truncated monomeric von Willebrand factor (VWF)

for the study of VWF proteolysis. Thromb Haemost, Suppl July: Abstract#1667

- 5 8. Kasper, C.K. (1991) Laboratory tests for factor VIII inhibitors, their variation, significance and interpretation. Blood Coagul Fibrinolysis 2: 7 – 10.

* * * * *

Patentansprüche:

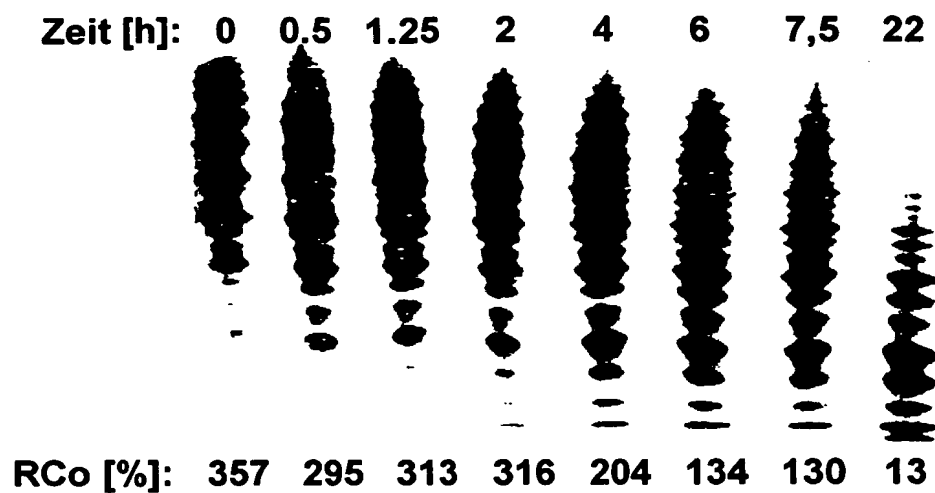
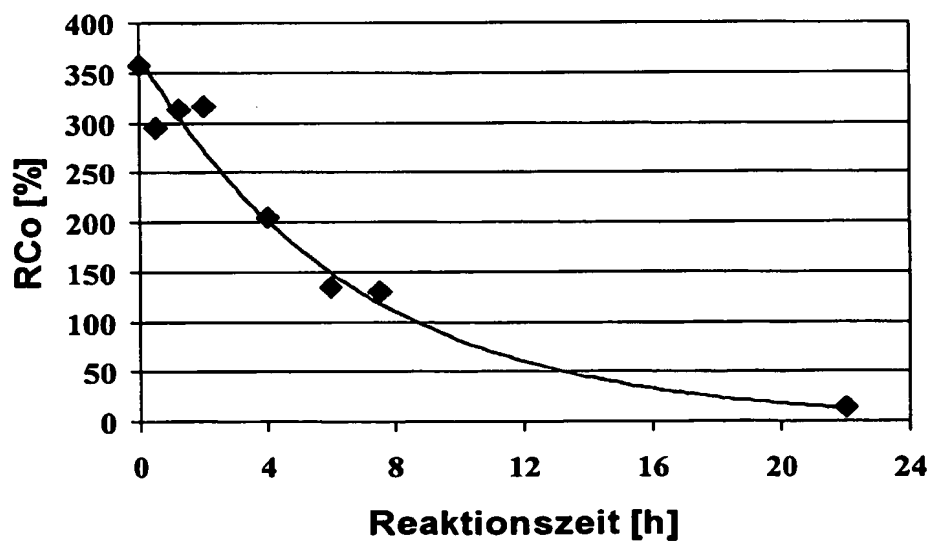
1. Diagnostisches Verfahren zur Bestimmung der VWF-spaltenden Aktivität von ADAMTS-13 in einem Testmedium, wobei man das Testmedium mit 0,5 bis 5 U/ml eines ADAMTS-13-freien von Willebrand Faktors (VWF) versetzt und nach Inkubation die ADAMTS-13-Aktivität über den Abfall der VWF-vermittelten Aggregation von Thrombozyten feststellt.
2. Diagnostisches Verfahren zur Bestimmung der VWF-spaltenden Aktivität von ADAMTS-13 in einem Testmedium, wobei man ADAMTS-13-freien von Willebrand Faktor (VWF) mit Thrombozyten versetzt, wobei die Thrombozyten aggregieren und diese Mischung dann mit dem Testmedium versetzt und die ADAMTS-13-Aktivität über die Dissoziation der Thrombozytenaggregate bestimmt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren in Gegenwart von Ristocetin durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Feststellung des Abfalls der VWF-vermittelten Aggregation von Thrombozyten mit Hilfe einer Eichkurve vorgenommen wird, wobei für die Erstellung der Eichkurve humanes Normalplasma verwendet wird, welches mit variierenden Mengen inaktiviertem humanem Normalplasma verdünnt ist.
5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Feststellung der Dissoziation der Thrombozyten mit Hilfe einer Eichkurve vorgenommen wird, wobei für die Erstellung der Eichkurve humanes Normalplasma verwendet wird, welches mit variierenden Mengen inaktiviertem humanem Normalplasma verdünnt ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass ein Serinproteaseinhibitor verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass kein Serinproteaseinhibitor verwendet wird.
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass zweiwertige Kationen verwendet werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass keine zweiwertige Kationen verwendet werden.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der ADAMTS-13-freie VWF an eine Festphase gebunden ist.
- 15 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase eine partikuläre Festphase ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Testmedium Blutplasma ist.
- 20 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Testmedium Blutserum ist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Testmedium Speichel ist.
- 25 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Testmedium Liquor ist.
- 30 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Testmedium Zellkulturüberstand ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Testmedium Zellextrakt ist.
- 5 18. Diagnose-Kit, enthaltend einen ADAMTS-13-freien VWF und Thrombozyten.
19. Diagnose-Kit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass er ferner Ristocetin enthält.
- 10 20. Verwendung eines VWF-Aktivitäts-Nachweis-Reagenzes zur Detektion der Protease ADAMTS-13.

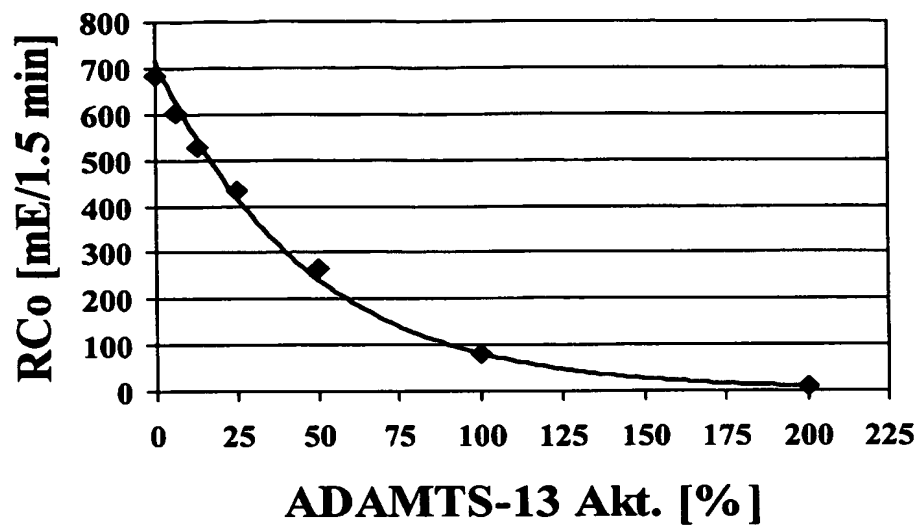
* * * * *

1/5

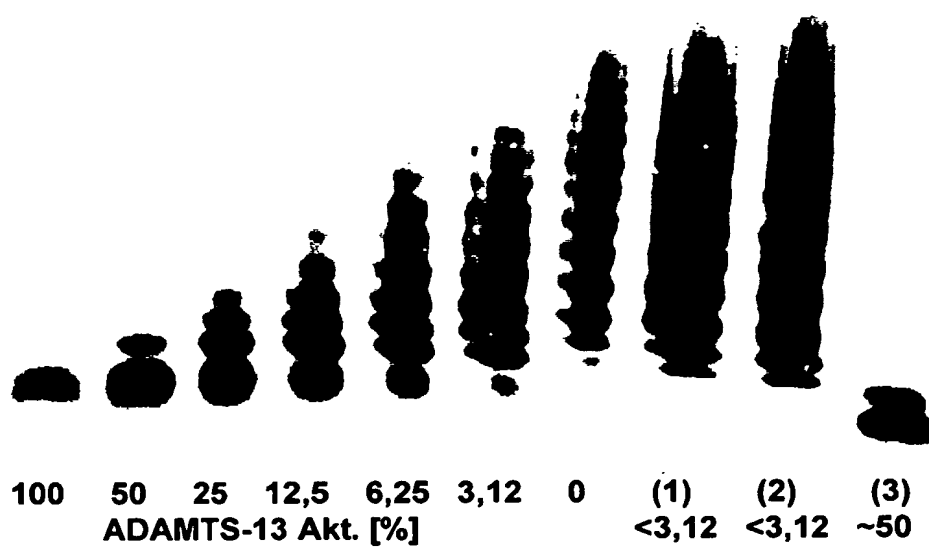
Figur 1a**Figur 1b**

BEST AVAILABLE COPY

2/5

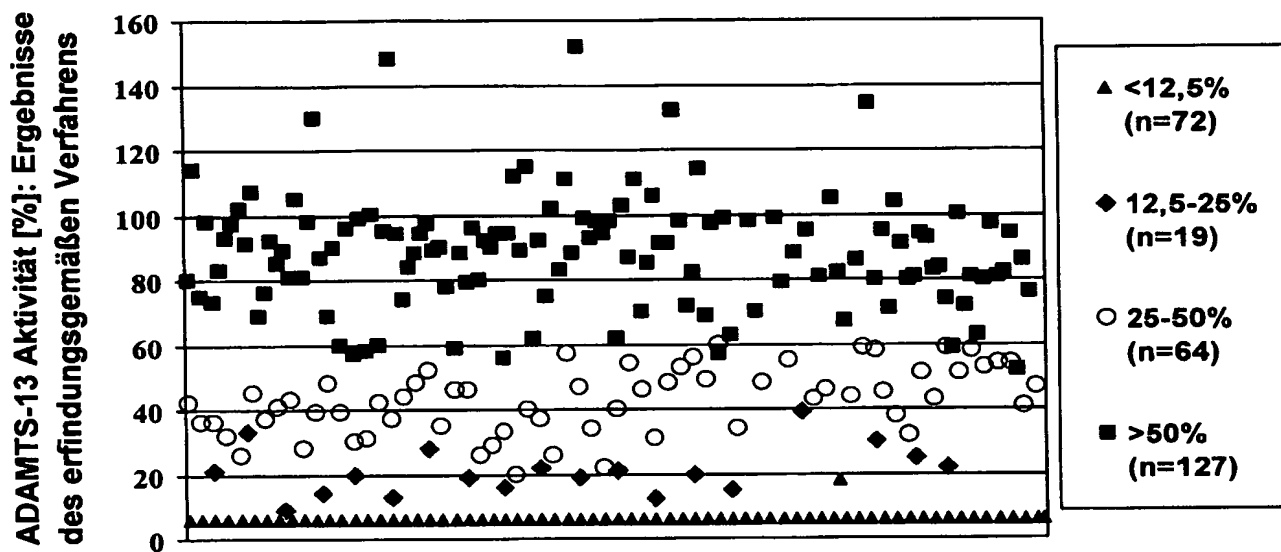
Figur 2

3/5

Figur 3

BEST AVAILABLE COPY

4/5

Figur 4

5/5

Figur 5